



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 9/08	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/13611 (43) Date de publication internationale: 19 septembre 1991 (19.09.91)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00206 (22) Date de dépôt international: 13 mars 1991 (13.03.91) (30) Données relatives à la priorité: 90/03188 13 mars 1990 (13.03.90) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement) : BENVENISTE, Jacques [FR/FR]; 3, rue La Rochelle, F-75014 Paris (FR). (74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc. ; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: PROCESS FOR MAKING HIGHLY DILUTED HOMEOPATHIC COMPOSITIONS OR PREPARATIONS FROM AN INITIAL SOLUTION CONTAINING AN ACTIVE SUBSTANCE		
(54) Titre: PROCEDE DE FABRICATION DE COMPOSITIONS HOMEOPATHIQUES OU DE PREPARATIONS A HAUTE DILUTION A PARTIR D'UNE SOLUTION INITIALE CONTENANT UNE SUBSTANCE ACTIVE		
(57) Abstract The object of the invention is a process for making highly diluted homeopathic compositions or preparations from a solution of given dilution, itself originating from an initial solution containing an active substance, in which said initial solution is subject to successive dilutions, each solution going from that of first dilution to that of last dilution, constituting a solution of given dilution, wherein the solution of given dilution is subjected to an agitation stage at least after every tenth dilution and preferably after every third dilution and more preferably after every dilution, where the agitation consists of a stage of creating bubbles in the solution of given dilution (hereinafter referred to as "bubbling") by blowing gas in at an adequate rate of agitation to form a vortex in the solution of given dilution to be agitated. (57) Abrégé L'invention a pour objet un procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution à partir d'une solution de dilution déterminée, elle-même provenant d'une solution initiale contenant une substance active, dans lequel cette solution initiale est soumise à des dilutions successives, chacune des solutions allant de la solution de première dilution à la solution de dernière dilution constituant une solution de dilution déterminée, procédé dans lequel on procède à une étape d'agitation de la solution de dilution déterminée au minimum après toutes les dix dilutions, de préférence après toutes les trois dilutions et avantageusement après chaque dilution, l'agitation étant constituée par une étape de création de bulles dans la solution de dilution déterminée (ci-après désignée par "bullage") à l'aide d'insufflation de gaz à un taux d'agitation suffisant pour créer la formation d'un vortex dans la solution de dilution déterminée à agiter.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

**PROCEDE DE FABRICATION DE COMPOSITIONS HOMEOPATHIQUES
OU DE PREPARATIONS A HAUTE DILUTION A PARTIR D'UNE
SOLUTION INITIALE CONTENANT UNE SUBSTANCE ACTIVE**

L'invention a pour objet un nouveau procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution à partir d'une solution initiale contenant une substance active.

L'invention a également pour objet un appareil automatique pour la mise en oeuvre du procédé sus-mentionné.

Jusqu'à ce jour, les techniques de fabrication utilisées pour la préparation de compositions homéopathiques s'inspirent de celles préconisées par Hannemann et il s'agit principalement de la trituration, de l'imprégnation et de la dilution (par exemple, centésimale ou décimale).

La technique de dilution permet de préparer des dilutions homéopathiques qui sont susceptibles d'être utilisées telles quelles ou qui sont incorporées à un excipient neutre pour la mise en forme galénique qui constitue le médicament fini.

En ce qui concerne la technique de fabrication par dilution centésimale, on peut procéder de la façon suivante :

- on dispose une série de flacons et de bouchons lavés à l'eau et séchés, en nombre correspondant au numéro de la dilution centésimale à obtenir;
- on met dans le premier flacon une partie en poids de la substance de base complétée à 100 parties en poids en volume au moyen du véhicule approprié;
- on secoue au minimum 100 fois; la dilution obtenue est la première CH; on prélève une partie en volume de cette première CH et on verse dans le deuxième flacon contenant déjà 99 parties du véhicule;

2

- on secoue également 100 fois; la dilution obtenue ainsi est la deuxième CH.

Pour les dilutions décimales, on opère de façon identique, mais selon la série décimale.

L'étape de secousse précédemment évoquée constitue la dynamisation.

Cette étape de secousse est également appelée agitation ou succussion, et elle est d'une importance fondamentale, pour l'obtention de compositions homéopathiques actives.

A ce jour, de façon industrielle, le procédé de préparation de médicaments homéopathiques repose sur l'utilisation de deux dispositifs : l'un est un dispositif de dilution classique et le second un dispositif d'agitation. Entre chaque étape, la solution à diluer est extraite du dispositif de dilution et est mise dans le dispositif de succussion, puis à nouveau dans le dispositif de dilution pour l'étape suivante.

La mise en oeuvre de ce procédé implique des manipulations manuelles des tubes, ce qui constitue une perte de temps et une possibilité d'erreur.

L'un des aspects de l'invention est de fournir un procédé de préparation de compositions homéopathiques dans lequel l'étape de succussion est simplifiée.

L'un des aspects de l'invention est de fournir un procédé de préparation qui peut être automatisé en réduisant les pertes de temps et les sources d'erreur.

L'un encore des aspects de l'invention est de proposer une machine entièrement automatisée.

Le procédé de l'invention de préparation de compositions homéopathiques à partir de solutions de dilution déterminée, elles-mêmes provenant d'une solution initiale contenant une substance active, dans lequel la solution initiale contenant la substance active subit une série d'étapes de dilution

successives, la première dilution de la solution initiale étant obtenue par prélèvement d'une fraction ou de la totalité de la solution initiale, et le mélange de cette fraction ou de la totalité de la solution initiale dans une solution de dilution, ce qui donne la solution de première dilution, la deuxième dilution de la solution initiale étant obtenue par prélèvement d'une fraction ou de la totalité de la solution de première dilution, et le mélange de cette fraction ou de la totalité de la solution de première dilution dans une solution de dilution, pour donner la solution de deuxième dilution et ainsi de suite, jusqu'à la solution de dernière dilution,

chacune des solutions allant de la solution de première dilution à la solution de dernière dilution, constituant une solution de dilution déterminée, est caractérisé en ce qu'on procède à une étape d'agitation de la solution de dilution déterminée au minimum après toutes les dix dilutions, de préférence après toutes les trois dilutions, avantageusement après chaque dilution, l'agitation étant constituée par une étape de création de bulles dans la solution de dilution déterminée à l'aide d'insufflation de gaz à un taux d'agitation suffisant pour créer la formation d'un vortex dans la solution de dilution déterminée à agiter.

Par "vortex", on désigne un tourbillon créé dans une solution intermédiaire, par du gaz insufflé sous une pression suffisante.

Par simplification, l'expression "création de bulles" sera désignée par le terme "bullage".

Par "compositions homéopathiques", il faut comprendre les compositions obtenues à partir de solutions de dilution déterminée contenant des substances actives à des doses très faibles, voire à

des doses infinitésimales et des compositions dans lesquelles il n'y a plus de substance active.

De préférence, la première dilution est effectuée en prélevant une partie de la solution initiale, et chacune des dilutions déterminées est effectuée en prélevant une partie de la solution de dilution précédente.

Pour fixer les idées, les compositions homéopathiques provenant de solutions de dilution déterminée obtenues par le procédé de l'invention sont telles que la substance active est inférieure à 10^{-10} moles/l, avantageusement inférieure à 10^{-12} moles/l, et de préférence inférieure à 10^{-14} moles/l, ou ne contiennent plus de substance active.

Dans le procédé de l'invention, on a simplifié l'étape d'agitation par une étape de bullage à l'aide d'insufflation de gaz à un taux d'agitation suffisant pour créer la formation d'un vortex dans la solution à agiter.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, le bullage est effectué après chaque dilution.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, certaines des étapes d'agitation peuvent être effectuées manuellement par exemple en plaçant le récipient contenant la solution à agiter sur un appareil à agitation par excentrique.

On peut par exemple après la première dilution, agiter la solution de première dilution manuellement comme indiqué ci-dessus, puis utiliser le bullage, conformément à l'invention.

Le gaz insufflé peut être constitué par de l'azote, avantageusement par de l'air.

Pour créer la formation d'un vortex dans la solution à agiter par l'intermédiaire du bullage, le

gaz responsable de l'agitation peut être insufflé à une pression d'environ 5 à environ 6 bars.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, le taux d'agitation approprié est obtenu par insufflation d'air d'un volume allant d'environ du tiers à environ une fois le volume de la solution à agiter, le volume d'air insufflé étant avantageusement un volume d'environ 100 μ l à environ 10 ml, notamment 500 μ l, sous une pression suffisante, et telle que la température ne dépasse pas environ 45°C.

Selon un autre mode de réalisation du procédé de l'invention, on effectue, entre deux dilutions successives, une étape de rinçage du dispositif qui permet le prélèvement d'une fraction de la totalité de la solution initiale et de chaque solution intermédiaire et le mélange de cette fraction ou de la totalité dans une solution de dilution.

L'étape de rinçage entre deux dilutions successives (respectivement désignées par "dilution venant en premier lieu" et "dilution venant en deuxième lieu") peut être effectuée entre la dilution venant en premier lieu et le bullage de la solution de dilution déterminée correspondante, ou peut avoir lieu après le bullage, ou peut être concomitante à chaque dilution.

Dans ce dernier cas, pour ce faire, et à titre d'exemple relatif au rinçage concomitant à la dilution venant en deuxième lieu, on prélève de la dilution venant en premier lieu une quantité de celle-ci avec le dispositif rincé (de façon concomitante à la dilution venant en premier lieu), quantité que l'on introduit dans le tube destiné à la dilution venant en deuxième lieu, puis on prélève avec le même dispositif environ la moitié du volume nécessaire à la dilution venant en deuxième lieu, et on le rejette dans le tube

destiné à la dilution venant en deuxième lieu et on prélève encore environ la moitié du volume nécessaire à la dilution venant en deuxième lieu et on le rejette dans le tube destiné à la dilution venant en deuxième lieu, ce qui a pour effet de rincer deux fois le dispositif qui a suivi le prélèvement servant à effectuer la dilution venant en deuxième lieu, et ainsi de suite.

Dans ce qui suit, le procédé tel que défini ci-dessus sera désigné par "procédé comportant l'étape de bullage".

L'invention concerne un appareil automatique pour la mise en oeuvre du procédé défini ci-dessus, comprenant:

- des moyens pour effectuer les dilutions successives d'une solution initiale contenant une substance active, lesquelles dilutions conduisent à des solutions de dilution déterminée,
- des moyens de bullage programmés pour effectuer le bullage au minimum après toutes les dix dilutions, avantageusement après toutes les trois dilutions et de préférence après chaque dilution,
- éventuellement des moyens de rinçage entre chaque dilution.

L'étape de dilution est constituée par ce qui a été indiqué ci-dessus, mais peut être effectuée de toute autre façon par exemple selon la méthode de Korsakow en flacon unique, ou bien selon la méthode des 50 millésimales ou encore selon la méthode par fluxion continue.

La solution initiale et la solution de dilution peuvent être des solutions alcooliques ou de glycérine et sont avantageusement des solutions aqueuses.

Le procédé de l'invention de préparation de compositions homéopathiques peut également comporter

un contrôle de la dilution et de la contamination de solutions de dilution déterminée.

Le procédé de préparation de compositions homéopathiques à partir de solutions de dilution déterminée provenant d'une solution initiale contenant une substance active, lequel procédé comprend le contrôle de la dilution et de la contamination de la susdite solution de dilution déterminée, et est tel que la solution initiale

- subit des dilutions successives, la première dilution de la solution initiale étant obtenue par prélèvement d'une fraction ou de la totalité de la solution initiale, et le mélange de cette fraction ou de la totalité de la solution initiale dans une solution de dilution, ce qui donne la solution de première dilution, la deuxième dilution de la solution initiale étant obtenue par prélèvement d'une fraction ou de la totalité de la solution de première dilution, et le mélange de cette fraction ou de la totalité de la solution de première dilution dans une solution de dilution, pour donner la solution de deuxième dilution et ainsi de suite, jusqu'à la solution de la dernière dilution, chacune des solutions allant de la solution de première dilution à la solution de dernière dilution constituant une solution de dilution déterminée,

- les dilutions successives étant telles qu'au moins une des solutions de dilution déterminée contient la substance active en quantité inférieure à 10^{-10} moles, avantageusement inférieure à 10^{-12} moles/l et de préférence inférieure à 10^{-14} moles/l, ou ne contient plus de substance active, ladite solution de dilution déterminée présentant encore une activité à des dilutions supérieures à celle à laquelle la substance active a disparu, est caractérisé en ce que

- on introduit, avant au moins l'une quelconque des dilutions n , n étant un nombre entier supérieur à 0, dans la solution de dilution $n-1$ une substance témoin soluble dans ladite solution et n'interférant pas avec la solution de dilution $n-1$, et la substance témoin présentant la propriété de disparaître entre la dilution $n - 1 + m$ et $n + m$, m étant le nombre de dilutions où est présente la substance témoin, et étant compris notamment de 5 à 8,

- on dose au moins une fois la substance témoin après la dilution n , de préférence au moins une fois dans l'intervalle allant de la dilution n à la dilution $n - 1 + m$ et au moins une fois dans l'intervalle allant de la dilution $n + m$ à la dilution $n + m + y$, y étant la plage de dilution libre de substance témoin et étant avantageusement compris de 3 à 5,

- et de la dilution n à la dilution $n - 1 + m$, on compare la valeur de la concentration de la substance témoin obtenue et la valeur de la concentration de la substance témoin calculée d'après la dilution, ce qui permet de contrôler quantitativement les dilutions, et
- de la dilution $n + m$ à la dilution $n + m + y$, on vérifie qu'il n'y a plus de substance témoin, ce qui permet de contrôler d'une part la qualité des dilutions et d'autre part l'absence de contamination.

Dans ce mode de réalisation du procédé de l'invention, on utilise comme substance témoin, d'une substance qui est facilement détectable et qui est détectable jusqu'à ce qu'elle disparaisse. De façon avantageuse, on utilise une enzyme détectable par son activité chromogène.

La présence de la substance témoin dans les premières dilutions et son absence dans les dilutions extrêmes, (c'est-à-dire dilutions supérieures à la quatorzième dilution et notamment à la vingt-troisième dilution) qui sont néanmoins actives, affirment la

relation entre le phénomène observé et le mécanisme des hautes dilutions. On part d'une solution initiale contenant une substance active et on la dilue une première fois à l'aide d'une solution de dilution, ce qui conduit à une solution de première dilution, laquelle est à son tour diluée, pour donner une solution de deuxième dilution, et ainsi de suite pour donner les dilutions successives, jusqu'à la solution de dernière dilution. Chacune des dilutions conduit à une solution de dilution déterminée.

Le procédé de l'invention est tel qu'il permet de contrôler à chacune des dilutions (qui donne lieu à une solution de dilution déterminée), si la dilution a été correctement faite et s'il n'y a pas de contamination. Une dilution incorrecte pourrait, par exemple, consister en l'oubli d'une dilution antérieure ou en l'introduction d'une goutte, contenant par exemple la substance active à la dernière dilution détectée, ou l'utilisation d'une pipette mal rincée, ce qui à de telles dilutions risque de tout changer.

Le procédé est tel qu'il permet de contrôler chacune des dilutions et lorsque la substance témoin est encore présente, de quantifier la dilution en comparant la quantité théorique calculée de substance témoin et la quantité effectivement trouvée. Lorsqu'il n'y a plus de substance témoin, il n'y a plus non plus de substance active puisque la substance témoin disparaît après la substance active. Après un certain nombre de dilutions on doit s'attendre non seulement à l'absence de substance active, mais aussi à l'absence de substance témoin.

Comme indiqué ci-dessus, les dilutions seront repérées par première dilution, deuxième dilution, troisième dilution, *én*ième dilution ou encore dilution

1, 2, 3, 4, ... n. De façon habituelle, les dernières dilutions sont les dilutions 30 ou 40 (décimales).

Ces dilutions peuvent être faites selon n'importe quelle échelle, notamment décimale ou centésimale.

Dans tout ce qui précède et dans tout ce qui suit, les valeurs chiffrées correspondent, sauf indications contraires, aux dilutions décimales.

Mais, le terme "dilution" peut s'appliquer aux dilutions centésimales. Au fur et à mesure des dilutions, la solution diluée sera telle qu'elle contient 10^{-10} moles/l, puis 10^{-12} moles/l, puis une quantité inférieure à 10^{-14} moles/l. Généralement au-delà de cette concentration molaire par litre il n'y a plus de molécules dans la solution, ce qui n'empêche pas ladite solution diluée de présenter encore, et d'une façon tout à fait inattendue, une activité.

Dans le procédé de l'invention, on peut introduire la substance témoin avant n'importe quelle dilution, c'est-à-dire dans n'importe quelle solution de dilution déterminée.

Par "substance témoin n'interférant pas avec la solution de dilution n - 1" on définit une substance témoin telle que sa présence n'a aucune incidence sur l'activité éventuelle de la solution de dilution n - 1.

Lorsqu'on a introduit la substance témoin à la dilution n - 1 et que l'on procède à une première dilution de la solution de dilution n - 1 contenant la substance témoin, on continue ensuite à diluer jusqu'à ce qu'on atteigne une dilution à laquelle la substance témoin disparaît. Le procédé de l'invention implique au moins un dosage de la substance témoin après la dilution n. Ce dosage a lieu de préférence au moins une fois dans l'intervalle allant de la dilution n à la dilution n - 1 + m, c'est-à-dire au moins une fois

de la première dilution de la substance témoin à la dilution à laquelle la substance témoin disparaît.

Sur l'intervalle allant de la dilution n à la dilution $n - 1 + m$ de la substance témoin, on peut faire en principe un dosage quantitatif puisqu'on peut après chacune des dilutions de n à $n - 1 + m$ doser la substance témoin et la comparer avec la valeur correspondante théorique calculée.

Lorsque la substance témoin est telle qu'elle n'est plus présente dans aucune solution de dilution déterminée, il est également avantageux de faire un dosage par exemple sur les trois dilutions qui suivent celle à partir de laquelle la substance témoin a disparu, dilution pendant laquelle on n'ajoute pas de substance témoin.

Ceci permet de confirmer qu'il n'y a pas eu de contamination par rapport à la dilution à laquelle on constate qu'il n'y a plus de substance témoin. Dans ce cas, il ne s'agit plus d'un contrôle quantitatif mais d'un contrôle qualitatif permis par l'absence de la substance témoin, la substance témoin se comportant alors comme un témoin négatif.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, on introduit au moins deux fois la substance témoin, l'une des deux introductions de la substance témoin étant effectuée dans la solution de dilution $n - 1$, la substance témoin disparaissant entre la dilution $n - 1 + m$ et $n + m$, l'autre introduction est effectuée au plus tôt dans la solution de dilution $n + m$, et de préférence dans la solution de dilution $n + m + y$, n étant un nombre entier supérieur à 0, m étant avantageusement compris de 5 à 8, y étant avantageusement compris de 3 à 5.

Ce procédé correspond au fait que l'on introduit une première fois la substance témoin dans la solution de dilution $n - 1$, on dilue jusqu'à l'obtention d'une

solution de dilution dans laquelle la substance témoin a disparu et sans ajouter à nouveau de substance témoin avant que celle-ci n'ait disparu, sinon le dosage effectué sur chacune des dilutions de la solution de dilution n à la dilution dans laquelle la substance témoin a disparu n'aurait plus de sens.

On attend donc que la substance témoin ait disparu pour en ajouter à nouveau. On peut ajouter à nouveau de la substance témoin à la dilution qui suit tout de suite celle pour laquelle la substance témoin a disparu, mais de façon avantageuse, on ajoute à nouveau la substance témoin de 2 à 10 dilutions qui suivent la dilution à laquelle la substance témoin a disparu pour la première fois, et avantageusement à partir de la troisième, quatrième ou cinquième dilution qui suit la dilution correspondant à la disparition de la substance témoin.

On peut ainsi répéter le procédé d'introduction de la substance témoin toutes les fois que celle-ci a disparu ou en attendant 3 dilutions à 5 dilutions après la dilution à partir de laquelle la substance témoin a disparu.

En pratique, selon le procédé de l'invention, on peut réintroduire la substance témoin à intervalle régulier, et il suffit par exemple de pouvoir détecter la substance témoin sur 3 ou 4 dilutions, pour montrer que la diminution de la substance témoin est régulière (donc que les dilutions sont correctes) et qu'en dehors des zones où la substance témoin est détectable, il n'y a pas de contamination.

Selon un mode de réalisation du procédé de l'invention, on introduit la substance témoin pour la première fois dans la solution de dilution n - 1, puis on réintroduit la substance témoin dans la solution de dilution qui suit celle qui correspond à la disparition de la substance témoin introduite dans la

dilution $n - 1$, puis on réintroduit une deuxième fois la substance témoin dans la solution de dilution qui suit celle qui correspond à la disparition de la substance témoin réintroduite et ainsi de suite.

Selon un autre mode de réalisation du procédé de l'invention, on introduit la substance témoin pour la première fois dans la solution de dilution $n - 1$, la substance témoin disparaissant entre la dilution $n - 1 + m$ et $n + m$, m étant compris notamment de 5 à 8, on réintroduit la substance témoin dans la solution de dilution $n + m + y$, y étant compris de 2 à 10, avantageusement de 3 à 5, et ainsi de suite.

Selon un autre mode de réalisation on introduit la substance témoin pour la première fois dans la solution de dilution $n - 1$, puis toutes les m dilutions, m étant compris de 5 à 15, avantageusement de 10 à 15, et avantageusement encore 10 ou 15.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention est tel que

- la solution initiale subit des dilutions successives, la première dilution de la solution initiale étant obtenue par prélèvement d'une fraction ou de la totalité de la solution initiale, et le mélange de cette fraction ou de la totalité de la solution initiale dans une solution de dilution, ce qui donne la solution de première dilution, la deuxième dilution de la solution initiale étant obtenue par prélèvement d'une fraction ou de la totalité de la solution de première dilution, et le mélange de cette fraction ou de la totalité de la solution de première dilution dans une solution de dilution, pour donner la solution de deuxième dilution et ainsi de suite, jusqu'à la solution de la dernière dilution,

- chacune des solutions allant de la solution de première dilution à la solution de dernière dilution constituant une solution de dilution déterminée,
- chaque solution de dilution déterminée subit une agitation vigoureuse,
- les dilutions successives étant telles qu'au moins une des solutions de dilution déterminée contient la substance active en quantité inférieure à 10^{-10} moles, avantageusement inférieure à 10^{-12} moles/l et de préférence inférieure à 10^{-14} moles/l, ou ne contient plus de substance active, ladite solution de dilution déterminée présentant encore une activité à des dilutions supérieures à celle à laquelle la substance active a disparu,

caractérisé en ce que:

- on introduit, avant au moins l'une quelconque des dilutions n , n étant un nombre entier supérieur à 0, dans la solution de dilution $n-1$ une substance témoin soluble dans ladite solution et n'interférant pas avec la solution de dilution $n-1$,

* la substance témoin présentant la propriété d'être détectable à des dilutions supérieures à celle à partir de laquelle la substance active n'est plus détectable,

et

* la substance témoin présentant également la propriété de disparaître entre la dilution $n - 1 + m$ et $n + m$, m étant le nombre de dilutions où est présente la substance témoin et étant compris notamment de 5 à 8,

- on dose au moins une fois la substance témoin après la dilution n , de préférence au moins une fois dans l'intervalle allant de la dilution n à la dilution $n - 1 + m$ et au moins une fois dans l'intervalle allant de la dilution $n + m$ à la dilution $n + m + y$, y

étant la plage de dilution libre de substance témoin et étant avantageusement compris de 3 à 5,

- et de la dilution n à la dilution $n - 1 + m$ on compare la valeur de la concentration de la substance témoin obtenue et la valeur de la concentration de la substance témoin calculée d'après la dilution, ce qui permet de contrôler quantitativement les dilutions, et
- de la dilution $n + m$ à la dilution $n + m + y$, on vérifie qu'il n'y a plus de substance témoin, ce qui permet de contrôler d'une part la qualité des dilutions et d'autre part l'absence de contamination.

La substance témoin est douée de la propriété d'être détectable à des dilutions supérieures à celle à partir de laquelle la substance active n'est plus détectable, c'est-à-dire que si elle était introduite dans la solution initiale avant la première dilution de la solution de départ elle disparaîtrait à une dilution supérieure à celle à laquelle la substance active n'est plus détectable.

Pour fixer les idées, compte tenu des moyens techniques disponibles à ce jour, une substance est décelable par les moyens biochimiques habituels jusqu'à une quantité d'environ 10^{-6} moles/l.

Dans certains cas, les substances actives peuvent être détectables jusqu'à 10^{-12} moles/l. Mais, ceci implique des systèmes de détection très sensibles.

En ce qui concerne la substance témoin, de façon générale, elle est détectable jusqu'à environ 3×10^{-10} - 3×10^{-11} moles/l, ce qui correspond à la dilution 7 lorsque la concentration initiale est d'environ 0,1 environ 10 mg/l, notamment d'environ 1 mg/ml. La quantité en moles/l, jusqu'à laquelle la substance témoin est détectable correspond à la limite à partir de laquelle on considère qu'il n'y a plus de substance témoin.

Or, les substances actives utilisables dans le procédé de l'invention sont détectables à des concentrations d'environ 1×10^{-3} à 1×10^{-6} moles/l, c'est-à-dire jusqu'à environ la troisième dilution décimale, pour une concentration initiale d'environ 1×10^{-3} moles/l.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, la substance témoin est introduite à la dilution $n - 1$, et disparaissant entre la dilution $n - 1 + m$ et $n + m$, elle est réintroduite à la dilution $n + m + y$ l'intervalle $m + y + 1$ étant tel que,

- sur environ l'une des deux moitiés de cet intervalle les dilutions sont telles que les solutions de dilution correspondantes ne sont pas actives et
- sur environ l'autre moitié de cet intervalle, l'une au moins des solutions de dilution correspondantes est active.

On a représenté sur la Figure 1

- en traits pointillés la variation de l'activité de la solution de dilution en fonction de la dilution,
- en traits pleins la variation de la concentration initiale de la substance témoin ajoutée au départ en fonction de la dilution, et
- en traits pointillés courts - pointillés longs, la variation de concentration initiale de la substance active en fonction de la solution de dilution.

Pour fixer les idées, la concentration initiale de la substance témoin est d'environ 1 mg/ml, et celle de la substance active est d'environ 1 mg/ml.

Sur cette figure 1, donnée à titre illustratif et non limitatif, la substance témoin disparaît entre la dilution 7 et 8, la substance active disparaît entre la dilution 4 et 5, l'intervalle de dilution sur lequel la substance témoin est présente est de 0 à 8 dilutions. Sur la moitié de cet intervalle c'est-à-

dire de 0 à 4 dilutions, on constate que la solution présente une certaine activité alors que sur l'autre moitié de l'intervalle, c'est-à-dire de la quatrième à la huitième dilutions, la solution ne présente plus d'activité. Sur l'intervalle de 0 à 4 dilutions, la substance témoin est telle qu'il y ait une activité dans la solution de dilution correspondante et sur l'intervalle de 4 à 8 dilutions la substance témoin est telle qu'il n'y a seulement pas d'activité des solutions de dilutions correspondantes.

Selon un autre mode de réalisation, la substance témoin présente la propriété selon laquelle si elle est introduite dans la solution initiale avant la première dilution de la solution de départ et si la substance active disparaît (n'est plus détectable) entre la dilution p et la dilution $p + 1$, la substance témoin disparaît entre la dilution $p + x$ et la dilution $p + x + 1$, x étant compris notamment de 2 à 4, p étant compris notamment de 3 à 6.

Dans les définitions sus-indiquées, m correspond à $p + x$, lorsque la substance témoin est introduite dans la solution initiale avant la première dilution de la solution de départ.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le procédé comprend les étapes suivantes:

- on introduit la substance témoin dans la solution initiale contenant la substance active avant la première dilution de ladite solution initiale,
- on effectue les dilutions successives de la solution initiale contenant la substance active et la substance témoin, la première dilution de la solution initiale étant obtenue par prélèvement d'une fraction ou de la totalité de la solution initiale, et le mélange de cette fraction ou de la totalité de la solution initiale dans une solution de dilution, ce qui donne la solution de première dilution, la deuxième dilution

de la solution initiale étant obtenue par prélèvement d'une fraction ou de la totalité de la solution de première dilution, et le mélange de cette fraction ou de la totalité de la solution de première dilution dans une solution de dilution, pour donner la solution de deuxième dilution et ainsi de suite, jusqu'à la solution de la dernière dilution,

la substance active disparaît entre la dilution p et la dilution $p + 1$ et la substance témoin disparaît entre la dilution $p + x$ et la dilution $p + x + 1$, p étant compris de 3 à 6, x étant compris de 2 à 4, la solution présentant encore une activité pour au moins une dilution supérieure ou égale à la dilution $p + 1$,

- après la première dilution, on prélève pour au moins une dilution déterminée, à partir de la solution obtenue à l'issue de ladite dilution une quantité suffisante de solution pour doser la substance témoin, et de préférence on dose la substance témoin à chaque dilution de la dilution 1 à la dilution $p + x$ et de préférence au moins une fois de la dilution $p + x + 1$ à la dilution $1 + p + x + y$, y étant avantageusement compris de 2 à 10, avantageusement de 3 à 5, et avantageusement encore à chaque dilution de la dilution $p + x + 1$ à la dilution $1 + p + x + y$,

- et de la dilution 1 à la dilution $p + x$, on compare la valeur de la concentration de la substance témoin obtenue et la valeur de la concentration de la substance témoin calculée d'après la dilution, ce qui permet de contrôler quantitativement les dilutions et de la dilution $p + x + 1$ à la dilution $1 + p + x + y$, on vérifie qu'il n'y a plus de substance témoin, ce qui permet de contrôler d'une part qu'il n'y a pas eu contamination et d'autre part la qualité des dilutions,

et on procède à une étape d'agitation de la solution de dilution déterminée au minimum après toutes les dix

dilutions, de préférence après toutes les trois dilutions, avantageusement après chaque dilution, l'agitation étant constituée par une étape de bullage de la solution de dilution déterminée à l'aide d'insufflation de gaz à un taux d'agitation suffisant pour créer la formation d'un vortex dans la solution de dilution déterminée à agiter.

Selon un autre mode de réalisation on introduit pour la première fois la substance témoin avant la première dilution, puis on introduit la substance témoin pour la deuxième fois dans la solution de dilution qui suit celle à laquelle la substance témoin introduite pour la deuxième fois disparaît, puis on introduit une troisième fois la substance témoin dans la solution de dilution qui suit celle qui correspond à la disparition de la substance témoin introduite la deuxième fois, et ainsi de suite.

De façon avantageuse, chaque introduction de la substance témoin a lieu de 2 à 10, avantageusement 3 à 5 dilutions après celle qui correspond à la disparition de la substance témoin précédemment introduite.

Selon un autre mode de réalisation on introduit la substance témoin avant la première dilution et toutes les m dilutions, m étant compris de 5 à 15, avantageusement de 10 à 15, et avantageusement encore 10 ou 15.

Selon un autre mode de réalisation, on introduit la substance témoin pour la première fois dans la solution initiale, puis toutes les dix dilutions à partir de la solution initiale.

Selon un autre mode de réalisation on dose la substance témoin avantageusement toutes les 10 dilutions, et de préférence à chaque dilution.

Selon un autre mode de réalisation la solution initiale contient une substance active à raison d'environ 1×10^{-3} à environ 1×10^{-6} moles/l.

Selon un autre mode de réalisation, lorsque la substance témoin est constituée par une enzyme, celle-ci est choisie parmi la peroxydase, est notamment la peroxydase de raifort, détectable par sa réactivité avec le substrat D-phenylène diamine en milieu H_2O_2 .

La solution initiale et la solution de dilution sont des solutions aqueuses, d'alcool pur, ou de glycérine, et de façon avantageuse des solutions aqueuses.

L'invention concerne également un appareil automatique pour la mise en oeuvre du procédé défini ci-dessus, comprenant :

- des moyens pour effectuer les dilutions successives d'une solution initiale contenant une substance active, lesquelles dilutions conduisent à des solutions de dilution déterminée,
- des moyens de bullage programmés pour effectuer le bullage au minimum après toutes les dix dilutions, avantageusement après toutes les trois dilutions et de préférence après chaque dilution,
- éventuellement des moyens de rinçage entre chaque dilution,
- des moyens pour effectuer le contrôle de la dilution et de la contamination des solutions de dilution déterminée obtenues respectivement à l'issue des dilutions successives.

Les solutions de dilution déterminée, obtenues conformément au procédé défini ci-dessus comportant l'étape de bullage et éventuellement contrôlées quant à leur dilution et à leur contamination peuvent être utilisées telles quelles comme médicament fini, ou peuvent être utilisées en tant que solutions actives,

pour la fabrication de compositions homéopathiques galéniques solides et de toute préparation à haute dilution (au-delà de 1×10^{-10} M) à visée pharmacologique expérimentale et clinique (chez l'animal et chez l'homme, mais aussi en biologie végétale).

En ce qui concerne les compositions galéniques homéopathiques solides, on peut citer les granules ou globules, qui sont rendues actives par imprégnation dans une solution de dilution déterminée obtenue selon le procédé défini ci-dessus comportant l'étape de bullage et éventuellement contrôlée quant à sa pureté et sa contamination comme indiqué ci-dessus.

L'invention concerne également un procédé d'obtention d'une solution diluée présentant une activité moyenne dans lequel on mélange des solutions de dilution déterminée successives, obtenues conformément au procédé décrit ci-dessus, chaque solution étant de dilution différente, mais correspondant à la même échelle de dilution.

Les solutions de dilution déterminée obtenues conformément au procédé défini ci-dessus comportent l'étape de bullage et éventuellement contrôlées quant à leur dilution et à leur contamination, peuvent être utilisées soit individuellement, notamment pour des études de pharmacologie fondamentale, soit après mélange entre elles. En mélangeant plusieurs solutions de dilution déterminées, par exemple de 2 à 20 solutions de dilution successives (nombre préféré de dilutions mélangées : 10) correspondant à la même échelle de dilution (c'est-à-dire par exemple uniquement décimales ou uniquement centésimales, etc ...), on obtient une solution diluée ci-après désignée par "mélange" qui, expérimentalement, présente une activité moyenne. Ce procédé, consistant à utiliser des mélanges de solutions de dilution déterminée

successives, permet donc de pallier l'inconvénient d'utiliser des solutions de dilution déterminées individuelles pour lesquelles on ne peut pas toujours prévoir si elles seront actives ou non, au profit d'une activité moyenne, mais plus constante.

L'invention a également pour objet un procédé d'accroissement de l'activité d'une solution de dilution déterminée dans lequel on utilise une solution de dilution déterminée obtenue conformément au procédé décrit précédemment, caractérisé en ce que l'on soumet cette solution de dilution déterminée à une haute dilution unique.

L'invention a également pour objet un procédé d'accroissement d'activité d'une solution diluée (mélange) dans lequel les solutions de dilution déterminée utilisées sont obtenues selon le procédé décrit précédemment, caractérisé en ce que l'on soumet ledit mélange à une haute dilution unique.

Une solution de dilution déterminée ou un mélange obtenu comme indiqué ci-dessus, peut être utilisé tel quel en pharmacologie expérimentale ou en thérapeutique. Mais, on peut augmenter considérablement l'activité de cette solution de dilution déterminée ou de ce mélange en procédant à une très haute dilution unique, c'est-à-dire une petite quantité d'une solution de dilution déterminée ou du susdit mélange, diluée en une seule fois dans un grand volume de liquide diluant (eau, eau-alcool, alcool, ...), par exemple 10 microlitres dans 10 ml avec forte agitation. On obtient ainsi une activité biologique maximale. Le niveau de dilution unique doit être adapté à l'activité de la substance de départ et à la nature de la substance diluée. Le niveau de dilution est d'au moins 100, mais on peut diluer en une seule fois sans limite supérieure, celle-ci n'étant indiquée que par la possibilité matérielle de

distribuer un très faible volume dans un très grand. En pratique, il peut être de 100 à 10^5 . Par exemple, un facteur de 1×10^5 demande de diluer un microlitre dans cent litres. La meilleure zone de dilution doit donc être déterminée à chaque cas selon la sensibilité du système biologique et la nature de la substance à diluer.

EXEMPLE I :

Cet exemple est relatif au contrôle de l'activation et de l'inhibition de l'achromasie des basophiles humains, en utilisant le procédé comprenant les étapes de bullage et de vérification de la dilution et de la contamination selon l'invention.

Plus précisément, dans cet exemple, on vérifie l'effet des hautes dilutions d'un anticorps anti-IgE sur les basophiles humains, les solutions de haute dilution étant préparées et contrôlées quant à leur dilution et à leur contamination selon le procédé de l'invention.

I- PRELEVEMENT SANGUIN :

Il est effectué chez des sujets ne présentant aucune allergie reconnue, ni séro-positifs ni hépatite-positifs.

Vingt ml de sang de ces donneurs sont recueillis dans deux tubes en verre glycérinés contenant chacun 250 μ l d'anticoagulant ainsi préparé :

- Mélanger (1:1) deux solutions d'EDTA- Na_2 et d'EDTA- Na_4 (Merck, Darmstadt, RFA) 0,2 M, pH 7,40.

- * EDTA- NaCl_2 (PM=372,24) : 3,7 g dissous dans 50 ml d'eau distillée chauffée,

- * EDTA- Na_4 (PM=452,24) : 4,5 g dissous dans 50 ml d'eau distillée froide.

- A 100 ml du mélange, on ajoute de l'héparine sans phénol (Choay, Paris, France) à la concentration

finale de 40 U/ml (c.a.d. 4000 U dans 100 ml de solution d'EDTA).

Les tubes contenant l'anticoagulant (250 μ l/tube) sont préparés à l'avance et conservés à +4°C.

II- PREPARATION DES TAMPONS :

On dispose de deux tampons :

- un tampon de lavage, ne contenant pas de calcium, nécessaire à la préparation des cellules;
- un tampon de dilution, contenant du calcium, nécessaire à la préparation des dilutions.

Ces deux tampons sont préparés extemporanément à partir du tampon de Tyrode stock suivant :

1. Tampon de Tyrode tamponné à l'HEPES : "Tyrode-HEPES"

Produits	Molarité (mM)	PM	g/litre
KCl	2,6	74,6	0,195
NaCl	137,0	58,4	8,0
Glucose	5,55	180,16	1,0
HEPES	10,0	260,0	2,6
EDTA-Na ₂ (sans acide)	2,3	292,2	0,672

Les produits sont dissous à chaud par agitation dans de l'eau ultra-pure (obtenue après traitement par une machine à osmose inverse et filtration). Le pH est ajusté à 7,40 avec NaOH 5N et 1N. Le tampon est alors filtré (filtre 2 μ m, Costar, Cambridge, USA) sous hotte stérile et conservé à +4°C durant 10 jours maximum.

Source des produits :

KCl, NaCl, Glucose, EDTA-Na₄ sont des réactifs pour culture cellulaire, Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, USA.

HEPES, Seromed ®, Biochrom KG, Berlin, RDA.

2. Le tampon de lavage :

C'est le tampon de Tyrode-HEPES ramené à la température ambiante et ajusté à pH 7,40 extemporanément.

3. Le tampon de dilution :

C'est le tampon de Tyrode précédent, porté à température ambiante et ajusté extemporanément à pH 7,40 après addition de calcium.

a) Solution stock de CaCl₂ 220 mM :

1,62 g de CaCl₂ 2H₂O dans 50 ml de tampon de Tyrode-HEPES à pH 7.40. La conservation a lieu à +4°C.

b) Tampon de dilution :

La concentration finale dans les dilutions est de 11mM : 5 ml de CaCl₂ 220 mM q.s.p. 100 ml de tampon de Tyrode-HEPES. Ajuster à pH 7,40 avec NaOH 1N ou 0,1N.

III- PREPARATION DES GAMMES DE DILUTIONS D'ANTI-IgE (TEST), D'ANTI-IgG ET D'EAU DISTILLEE ULTRA-PURE (CONTROLES) :

Les dilutions d'eau distillée ultra-pure ne sont pas préparées et testées systématiquement pour toutes les expériences.

1. Les antisérums anti-IgE et anti-IgG :

Il s'agit d'un antisérum de chèvre anti-IgG humaine (Fc spécifique, GAHu/IgG(Fc)) et d'un antisérum de chèvre anti-IgE humaine (Fc spécifique, GAHu/IgE(Fc)) (Nordic Immunology, Tilburg, The Netherlands) dont la concentration en anticorps est de 1 mg/ml.

Les antisérums lyophilisés sont repris par 1 ml d'eau distillée ultra-pure puis aliquotés en tubes eppendorf (15 µl/tube) et conservés à -20°C.

La concentration en anticorps est de 1 mg/ml.

2. Dilution des antisérums et de l'eau distillée ultra-pure :

Les dilutions se font sous le contrôle d'un chercheur étranger au laboratoire et responsable du traitement statistique des résultats (INSERM U292).

Elles sont réalisées sous hotte à flux laminaire sur un Automate Programmable 222-401E Gilson (Gilson Medical Electronics, France) en utilisant des tubes stériles neufs tirés au sort de 5 ml en polypropylène (Greiner). Le tampon de dilution utilisé est du tampon de Tyrode-HEPES contenant du calcium 11 mM et ajusté à pH 7,40.

On dilue d'abord l'eau distillée ultra-pure, puis l'anti-IgG, puis l'anti-IgE. Un cycle de rinçage est programmé au début et à la fin de chacune des gammes de dilutions. Celles-ci comportent 29 tubes allant de la dilution 1×10^2 à la dilution 1×10^{30} de l'eau distillée ultra-pure ou de la solution d'antisérum anti-IgG ou anti-IgE de départ.

A titre de traceur enzymatique permettant de juger de la bonne pratique des dilutions, on ajoute de la peroxydase (Sigma) en même temps que l'eau distillée ou l'antisérum anti-IgG ou anti-IgE. La solution de peroxydase a été préparée à 1 mg/ml, aliquotée en tubes eppendorf (15 μ l/tube) et conservée à -20°C.

Réalisation d'une gamme de dilutions :

Les 29 tubes de la gamme, vides et portant le numéro correspondant à leur dilution marqué au feutre, sont placés sur le portoir de l'appareil automatique Gilson.

Dans le premier tube, correspondant à la dilution 1×10^2 , 10 μ l d'eau distillée ou d'anti-IgG ou d'anti-IgE (1 mg/ml) et 10 μ l de peroxydase (1 mg/ml) sont ajoutés à 980 μ l de tampon de Tyrode contenant du

calcium 11 mM (tampon de dilution). Le tube est bouché et agité pendant 30 sec sur un Vortex.

La dilution 1×10^2 faite manuellement est remplacée sur le portoir et le programme de dilution automatique est alors engagé. Après un cycle de rinçage avec le tampon de dilution, une seringue de 500 μ l (piston inox) prélève 100 μ l de la dilution 1×10^2 et aspire 400 μ l du tampon de dilution. Le tout est rejeté dans le tube suivant, correspondant à la dilution 1×10^3 . Cinq cent μ l de tampon de dilution sont encore aspirés et rejetés dans le tube de la dilution 1×10^3 , ce qui assure le rinçage de la seringue. L'agitation de la dilution est assurée par une aspiration-refoulement de 500 μ l d'air, 5 fois de suite, au maximum de vitesse de refoulement. L'aiguille prélève ensuite 100 μ l de la dilution 1×10^3 , aspire 400 μ l puis 500 μ l de tampon de dilution selon le même processus que précédemment pour obtenir la dilution 1×10^4 et ainsi de suite.

A la dilution 1×10^{30} , l'appareil s'arrête automatiquement et enclenche un cycle de rinçage. Une nouvelle gamme peut alors être mise en oeuvre.

Schéma du processus de dilution automatique de l'antisérum anti-IgE :

Ce schéma fait l'objet de la figure 2, sur laquelle on a représenté le procédé de dilution automatique dans lequel les étapes d'agitation mentionnées par "bullage" sont faites conformément au procédé de l'invention et dans lequel l'étape d'agitation qui suit la première dilution est faite manuellement sur un appareil à agitation par excentrique.

3. Codage des tubes des dilutions d'eau distillée et d'antisérums :

Lors d'une expérience "activation", on teste :

- les dilutions pondérales 1×10^2 à 1×10^4 d'anti-IgE et du contrôle anti-IgG et/ou eau distillée;

- les hautes dilutions 1×10^{21} à 1×10^{30} (au-delà du nombre limite de molécules calculé grâce au nombre d'Avogadro) d'anti-IgE et du contrôle anti-IgG et/ou eau distillée. N'importe quelle partie de la gamme de dilution au-delà de la limite donnée par le nombre d'Avogadro peut être utilisée;

- les témoins internes contrôlant la sensibilité au calcium des basophiles et correspondant aux tampons de Tyrode sans calcium et de Tyrode avec calcium.

a) Réalisation du code :

Dans ce protocole "activation", tous les tubes sont testés en aveugle.

Le chercheur étranger au laboratoire et contrôlant la réalisation des expériences attribue à chacun des tubes, suivant une table de randomisation :

- un nombre compris entre 1 et 30 lorsque l'expérience compare l'efficacité des dilutions d'anti-IgE et d'anti-IgG;

- un nombre compris entre 1 et 43 lorsque l'expérience compare l'efficacité des dilutions d'eau distillée, d'anti-IgG et d'anti-IgE.

Pour ce faire, les numéros correspondant aux dilutions et marqués au feutre sur les tubes sont effacés à l'alcool et des étiquettes portant un numéro de code sont collées sur les tubes.

Exemple : dans le cas d'un code compris entre 1 et 30, les tubes codés seront :

- les tubes des dilutions 1×10^2 à 1×10^4 d'anti-IgG (3 tubes) et d'anti-IgE (3 tubes);

- les tubes des dilutions 1×10^{21} à 1×10^{30} d'anti-IgG (10 tubes) et d'anti-IgE (10 tubes);

- les tubes de contrôles internes : 1) tampon de dilution, Tyrode avec calcium (2 tubes); 2) tampon de lavage, Tyrode sans calcium (2 tubes).

b) Dédoublage de la gamme codée de 1 à 30 ou de 1 à 43 :

De chacun des tubes codés, on prélève 200 μ l (Pipetman 200) qui sont déposés dans des tubes d'agrégamètre de 1 ml. Les tubes sont bouchés et emportés par la personne ayant fait le code pour un dosage de contrôle éventuel, ultérieur et indépendant, des immunoglobulines pouvant être contenues dans les dilutions (dosage par électrophorèse sur gel de polyacrylamide) ou tout autre contrôle approprié (spectrométrie de masse etc...).

IV- PREPARATION CELLULAIRE :

Avant de procéder à l'obtention d'une suspension enrichie en basophiles à partir du sang recueilli sur l'anticoagulant héparine-EDTA (paragraphe I), on détermine le nombre de basophiles présents par mm^3 de sang total du sujet.

1. Coloration et comptage des basophiles sur sang total :

Les basophiles sont comptés grâce à leur propriété de coloration métachromatique avec le bleu de toluidine.

a) Solution de coloration : le bleu de toluidine :

Cent mg de bleu de toluidine (Toluidine Blue, CI N°52040 $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{S}$, $\text{PM}=305,84$, Fluka, Mulhouse, France) sont dissous dans 100 ml d'éthanol 25% et ajustés à pH 3,20-3,40 avec 80-100 μ l d'acide acétique glacial. La solution est conservée à température ambiante en bouteille hermétiquement close et à l'abri de la lumière.

b) La coloration :

Elle est réalisée en mélangeant 90 μ l de colorant et 10 μ l de sang total dans le puits à fond rond d'une plaque de microtitration (Costar). Le mélange est immédiatement et doucement agité par 5 à 6 aspirations et refoulements à l'aide de la pipette (Pipetman 200) ayant servi à déposer le colorant.

c) Comptage des basophiles :

Cinq à 10 minutes après le mélange du sang et du colorant, celui-ci est à nouveau doucement agité et immédiatement déposé dans une chambre de Fuchs-Rosenthal (3,2 mm³) à l'aide d'une pipette (Pipetman 200).

La lame est déposée en atmosphère humide (dans une boîte fermée et humidifiée) pour éviter son dessèchement. Après 3 à 5 minutes correspondant au temps nécessaire pour que la suspension colorée se dépose dans le chambre de l'hémocytomètre, on procède au comptage sur un microscope Olympus au grossissement G x 10 x 20.

Les basophiles sont les seules cellules ayant un cytoplasme coloré. Ils apparaissent rouges et sont très facilement identifiés sur un fond pâle. En cas de doute, il est nécessaire de modifier la mise au point de façon à bien distinguer les cytoplasmes colorés en rose-rouge des basophiles de ceux des autres cellules qui restent transparentes. Les noyaux des autres leucocytes sont légèrement colorés en bleu.

Généralement, sur sang total, on compte en moyenne 7 à 15 basophiles par chambre de Fuchs-Rosenthal, leur nombre pouvant aller de 2-3 à 30-35.

2. Obtention d'une suspension enrichie en basophiles :

Lorsque les 10 μ l nécessaires au comptage des basophiles sur sang total sont prélevés, du Dextran T500 4,% (Pharmacia, Uppsala, Suède) est ajouté à raison d'un volume pour cinq volumes de sang. Les

tubes sont inclinés et au fur et à mesure de la sédimentation (20 min environ à 1 x g à température ambiante), on recueille le plasma riche en leucocytes ainsi que des globules rouges en suspension. La présence de ces derniers renforcent la coloration des basophiles par le bleu de toluidine (observation empiriquement faite au laboratoire lors des essais expérimentaux).

La sédimentation est recueillie dans 2 tubes en plastique de 10 ml auxquels on ajoute du tampon de lavage (Tyrode-HEPES sans calcium, pH 7,40). Après centrifugation (150 x g, 10 min), les culots de leucocytes (+ globules rouges) sont réunis en un seul tube, suspendus dans 10 ml de tampon de lavage et centrifugés à nouveau (150 x g, 10 min). Le plasma riche en leucocytes est initialement séparé en 2 tubes afin de mieux laver les cellules.

Le culot est finalement repris dans un aliquote du même tampon, entre 400 et 900 μ l environ, en fonction du nombre de puits à déposer (10 μ l de suspension x fois le nombre de puits + 40 à 60 μ l supplémentaires pour les pertes sur les parois du tube).

On a représenté sur la figure 3 le schéma de la préparation cellulaire.

V- PROTOCOLE DE L'ACTIVATION DES BASOPHILES HUMAINS PAR L'ANTI-IGE (ANTI-IGG OU EAU DISTILLEE A TITRE DE CONTROLE) :

Après la préparation des dilutions d'antisérums anti-IgG et anti-IgE (et, pour une quinzaine d'expériences, des dilutions d'eau distillée) et leur codage, après obtention de la suspension enrichie en basophiles, on procède au test proprement dit, sous hotte à flux laminaire. Le processus est identique dans le cas du code à 30 tubes et du code à 43 tubes.

1. Le protocole :

- Dix μ l de tampon de lavage (Tyrode sans calcium) sont déposés au fond de 30 (ou 43) puits à fond rond d'une plaque de microtitration stérile (Costar), en évitant les puits périphériques où les risques de contamination et d'évaporation sont plus grands,

- vingt μ l de chacune des dilutions codées (code de 1 à 30 ou de 1 à 43) sont ensuite déposés au fond de ces mêmes puits,

- la plaque est préincubée 5 min à 37°C, sous scotch et couvercle pour éviter l'évaporation du contenu des puits,

- dix μ l de suspension enrichie sont ensuite ajoutés,

- la plaque est alors doucement agitée par lents mouvements de rotation afin d'homogénéiser le contenu de chacun des puits; il est important que cette agitation soit douce afin d'éviter toute contamination d'un puits à l'autre,

- la plaque est ensuite incubée 15 min à 37°C, sous ruban adhésif et couvercle pour éviter toute évaporation,

- après incubation, 90 μ l de bleu de toluidine sont ajoutés à chacun des puits et immédiatement agités par 5 à 6 aspirations et refoulements avec une pipette multicanaux. On change des cônes entre chaque rangée de puits,

- après coloration, la plaque est ruban adhésifiée et conservée une nuit à +4°C avant de procéder à la lecture. Sur cellules, lavées, la coloration est plus homogène après plusieurs heures.

2. Schéma de plaque :

Exemple : dans le cas d'un code de 1 à 30 :

X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X
X	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	X
X	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

† 10 µl tampon de lavage (Tyrode sans Ca⁺⁺)

+ 20 µl dilutions codées (1 à 30)

PREINCUBATION 5 min à 37°C

+ 10 µl suspension riche en basophiles (+ globules rouges)

INCUBATION 15 min à 37°C

+ 90 µl bleu de toluidine

CONSERVATION une nuit à +4°C puis LECTURE

3. Lecture au microscope optique. Comptage des basophiles :

Les basophiles sont comptés le jour suivant l'expérimentation par la même personne qui a préparé les cellules la veille. La technique est identique à celle du comptage des basophiles en sang total (paragraphe IV-1-c).

Lorsque le nombre de basophiles est important (supérieur à 100 sur une chambre entière de Fuchs-Rosenthal), il est possible de ne lire (pour tous les puits) qu'une demi-chambre. Si plus de 150 basophiles apparaissent sur une demi-chambre de Fuchs-Rosenthal, il est préférable de déposer le contenu des puits dans la chambre d'un hémocytomètre de Malassez (1 mm³).

Trois à cinq minutes sont nécessaires pour compter le contenu en basophiles d'une chambre d'hémocytomètre. Un expérimentateur entraîné peut

préparer 3 à 4 hémocytomètres en même temps à condition d'entreposer ceux-ci dans une boîte humidifiée afin d'éviter leur dessèchement. En cas de doute sur un compte, il est possible de redéposer le contenu d'un puits dans une chambre de Fuchs-Rosenthal pour procéder à un nouveau compte. Mais il est recommandé de ne pas renouveler cette opération plus de deux fois pour un même puits car il semble que les prélèvements répétés avec agitation puissent endommager l'échantillon et entraîner alors des résultats erratiques.

Les nombres de basophiles sont reportés dans un tableau à l'image du schéma de la plaque.

4. Contrôle de qualité des dilutions d'antisérums anti-IgG et anti-IgE : Dosage de la peroxydase :

La peroxydase est dosée le jour-même de l'expérimentation, indépendamment, par la deuxième personne prenant part au protocole et n'ayant pas fait l'expérience ce jour-là. Il a pour but de contrôler le processus de dilution et de déceler une éventuelle contamination des hautes dilutions par des concentrations pondérales d'antisérum, contamination qui serait alors responsable de l'activité biologique observée à haute dilution.

C'est un dosage par spectrophotométrie à 490 nm basé sur la réactivité de la peroxydase avec le substrat O-Phénylène-Diamine en milieu H_2O_2 .

a) Préparation des tampons et solutions :

- Tampon citrate pH 5,0

C'est un mélange de 20,5 ml d'une solution 0,1M d'acide citrique (PM=210,1) et de 29,5 ml d'une solution 0,1M de citrate de sodium (PM=294,1).

- Solution d'O-Phénylène-Diamine (OPD) :

Huit mg d'OPD (Sigma) sont dissous extemporanément dans 10 ml de tampon citrate pH 5,0.

La solution est conservée à l'abri de la lumière sous feuille d'aluminium.

b) Le dosage :

Dans les puits d'une plaque de microtitration 96 puits à fond plat (Costar), on dépose successivement :

- 50 μ l de chacune des dilutions codées (de 1 à 30 ou de 1 à 43) et des dilutions non codées (1×10^5 à 1×10^{20}) des gammes d'eau distillée, d'anti-IgG et d'anti-IgE (Pipetman 200).

- 50 μ l d'OPD à 8 mg/10 ml (pipette distributrice eppendorf).

- 10 μ l d' $H_2 O_2$ 30 vol. (pipette distributrice eppendorf).

On observe une coloration jaune-orange des puits correspondant aux dilutions les plus concentrées.

Laisser la réaction se faire pendant 10 minutes à l'abri de la lumière, sous aluminium.

Ajouter 50 μ l (pipette distributrice eppendorf) d' $H_2 SO_4$ 9% ($H_2 SO_4$ concentré, dilué 10 fois, 3% final dans le puits). La coloration précédemment observée s'accroît (coloration ocre-orange).

Lire immédiatement à 490 nm avec un spectrophotomètre-lecteur de plaque automatique (Dynatech Laboratories). Les résultats sont automatiquement enregistrés et imprimés.

Schéma de plaque :

Exemple dans le cas d'un code de 1 à 30 :

	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
numéros de code	X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X	} gammes codées
	X	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	X	
	X	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	X	
numéros des dilutions	X	X	X	X	X	5	6	7	8	9	10	X	} gamme anti-IgG
	X	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	X	
	X	X	X	X	X	5	6	7	8	9	10	X	} gamme anti-IgE
	X	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	X	

5) Les résultats "activation" :

Les résultats (nombres de basophiles + dosage peroxydase) sont remis chaque jour à la personne ayant fait les codes.

Les tubes correspondant à chaque expérience sont enfermés dans une enveloppe scellée et datée et conservée à +4°C, aux fins de contrôles ultérieurs.

a) Interprétation des résultats :

Elle sera faite après une analyse statistique indépendante, sur les expériences sélectionnées selon les critères suivants :

1. Nombre de basophiles dans les témoins supérieur à 35. Les témoins correspondent aux dilutions d'eau distillée, d'anti-IgG et aux témoins internes (tampon de Tyrode avec et sans Ca⁺⁺).

2. Activité anti-IgE à dose pondérale supérieur à 40% d'achromasie par rapport aux dilutions pondérales respectives d'eau distillée ou d'anti-IgG. (L'anti-IgG à dose pondérale peut théoriquement entraîner une achromasie des basophiles par rapport aux mêmes dilutions d'eau distillée ou par rapport aux témoins "Tyrode avec calcium". On peut invoquer une reconnaissance des chaînes légères de l'IgE par l'anti-IgG ou une réaction anaphylactique IgG-dépendante).

3. En présence de calcium seul, c'est-à-dire sans addition d'anti-IgE, le nombre de basophiles ne doit pas varier de plus de 25%. Ceci est vérifié en comparant le nombre des basophiles mis en présence de tampon de Tyrode-calcium avec celui des basophiles mis en présence de tampon de Tyrode sans calcium.

L'achromasie est ainsi déterminée :

$$\frac{\text{Nb basos du puits témoin} - \text{Nb basos du puits test}}{\text{Nb basos du puits témoin}} \times 100$$

basos = basophiles

Pour chaque expérience sélectionnée selon les critères :

1) calcul de la différence entre la moyenne du nombre de basophiles comptés dans les puits contenant la solution anti-IgE et la moyenne du nombre de basophiles comptés dans les puits contenant la solution témoin (eau distillée ou anti-IgG), pour toutes les dilutions comprises entre 1×10^{21} et 1×10^{30} .

2) recherche, également, pour les hautes dilutions d'anti-IgE, de la présence d'au moins un pic d'achromasie de 3 à 4 points successifs significatifs en fonction des données de l'abaque (paragraphe VI-2).

b) Représentation des résultats :

Elle est faite après ouverture des codes, au terme de 18 expériences d'activation interprétables (c.a.d. répondant aux critères de sélection).

Le nombre d'expériences nécessaires a été déterminé après analyse statistique des résultats fournis par des expériences préliminaires.

Les résultats sont représentés de la façon suivante :

Les dilutions (anti-IgE, anti-IgG ou eau distillée) logarithmiques sont portées en abscisses tandis que le nombre de basophiles est porté en ordonnées.

Chaque graphique correspond à une expérience. Il comporte :

1) une courbe qui représente les variations du nombre de basophiles en fonction des dilutions d'anti-IgE;

2) une (ou deux) courbe(s) contrôle(s) figurant les variations du nombre de basophiles en fonction des dilutions d'eau distillée et/ou d'anti-IgG.

En fonction du nombre moyen de basophiles obtenu pour les dilutions témoins d'eau distillée et pour le

témoin "Tyrode avec calcium", on définit une limite de significativité correspondant au nombre en-dessous duquel l'effet de l'anti-IgE (ou de l'anti-IgG) sera considéré comme significatif. Cette limite correspond le plus souvent à environ 20% d'achromasie. Elle est donnée par une abaque (cf. figure 4) et est représentée en pointillé sur les graphiques.

Plus le nombre de basophiles est faible par comparaison avec la moyenne des témoins, plus l'effet observé est significatif.

On a représenté sur la figure 4 l'abaque pour déterminer la significativité de l'achromasie des basophiles humains.

L'abaque indique la significativité ($p < 0,05$) de l'achromasie observée pour les basophiles. Exemple : lorsque 70 basophiles sont comptés dans le puits contrôle, 56 basophiles, au plus, doivent être comptés dans le puits test pour que l'achromasie soit significative.

VI- PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE LA MODULATION DE L'ACHROMASIE DES BASOPHILES PAR APIS MELLIFICA :

Ce protocole est pratiqué soit en même temps que le protocole "activation" lorsque le nombre de basophiles dans le sang total du donneur est suffisant (supérieur à 15 sur une chambre de Fuchs-Rosenthal), soit indépendamment du protocole "activation", sur le sang d'un autre donneur.

1) Principe :

L'effet modulateur de dilutions d'Apis mellifica de 15 à 20CH (Centésimale Hahnemannienne) est testé comparativement au contrôle correspondant, NaCl 137 mM 20CH sur l'achromasie des basophiles en présence de dilutions pondérales d'anti-IgE. L'effet d'Apis mellifica et de NaCl 137 mM est testé, à titre de contrôle, sur des basophiles mis en présence du seul tampon de dilution des anti-IgE, sans anti-IgE.

2) Les dilutions d'Apis mellifica et de NaCl 137 mM :

Elles sont fournies par les laboratoires Boiron-L.H.F. (Lyon, France) en ampoules stériles de 1ml, dans du NaCl 137 mM. Le contenu des ampoules est transvasé dans des tubes stériles neufs de 5 ml en polypropylène, sous hotte à flux laminaire. Les tubes sont bouchés au fur et à mesure et agités pendant 30 secondes sur un Vortex.

Des ampoules identiques sont adressées à un laboratoire extérieur afin de contrôler la qualité des produits par spectrométrie de masse.

3) Codage des dilutions d'Apis mellifica et de NaCl 137 mM :

Dans ce protocole, nous avons étudié l'effet modulateur des dilutions 15 à 20CH d'Apis mellifica comparativement à un contrôle, la dilution 20CH de NaCl 137 mM.

Toutes ces dilutions sont testées en aveugle. Un numéro de code arbitraire compris entre 1 et 8 est attribué au hasard à chacune des dilutions (6 dilutions 15 à 20CH d'Apis mellifica et 2 dilutions 20CH de NaCl 137 mM) par le chercheur étranger au laboratoire qui contrôle le processus et est responsable de l'interprétation statistique des résultats.

Pour ce faire, une étiquette portant un numéro de code est collée sur chacun des tubes contenant la dilution correspondante. Le code est changé à chaque nouvelle expérience, de nouvelles étiquettes portant un nouveau numéro remplaçant les précédentes.

Les tubes codés sont conservés d'une expérience à l'autre à +4°C sous feuille d'aluminium pendant 2 semaines. Après ce temps, une nouvelle procédure (transvasement des ampoules dans les tubes et codage)

est réalisée et ce, pendant toute la durée du protocole expérimental.

4) Les dilutions pondérales d'anti-IgE :

Les dilutions (1×10^2 à 1×10^4) sont préparées manuellement en tampon de dilution (tampon de Tyrode-HEPES + Ca^{++} 11 mM final, pH 7,40), sous hotte à flux laminaire, en tubes stériles de 5ml en polypropylène, à partir d'antisérum de chèvre anti-IgE humaine (1 mg/ml d'anticorps) aliquoté en tubes eppendorf et conservé à -20°C .

Dix μl d'anti-IgE (1 mg/ml) sont ajoutés à 990 μl de tampon de dilution. Le tube est bouché et agité pendant 30 secondes sur un Vortex : la dilution 1×10^2 est obtenue.

Cent μl en sont prélevés et ajoutés à 900 μl de tampon de dilution contenus dans un second tube. Celui-ci est bouché et agité à son tour pendant 30 secondes sur le Vortex. On obtient ainsi la dilution 1×10^3 et on procède de même pour la dilution 1×10^4 .

5) Le protocole lui-même :

Dans un premier temps ont donc été préparées :

- les dilutions d'Apis mellifica,
- les dilutions d'anti-IgE,
- la suspension cellulaire enrichie en basophiles (paragraphe IV).

Le test :

- Dix μl de chacune des 8 dilutions codées sont déposées au fond des puits à fond rond d'une plaque de microtitration stérile (Costar). Chacune des dilutions est déposée autant de fois que de doses d'anti-IgE à inhiber et une fois pour le tampon de dilution. Dans le présent protocole, les dilutions codées d'Apis mellifica et de NaCl 137 mM sont donc déposées 4 fois (anti-IgE 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 ; tampon de dilution).

- Dix μ l de suspension riche en basophiles sont ensuite déposés dans chacun des puits.

- La plaque est délicatement agitée par rotation très douce afin d'homogénéiser le contenu des puits et laissée 30 minutes à température ambiante, sous ruban adhésif et couvercle afin d'éviter toute évaporation.

- Après ce temps de préincubation des basophiles avec les produits 20 μ l d'anti-IgE aux dilutions 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 et 20 μ l de tampon de Tyrode-HEPES contenant du calcium 11 mM (et sans anti-IgE) sont ajoutés aux puits pour chacune des dilutions codées d'*Apis mellifica* et de NaCl 137 mM.

- La plaque est doucement agitée pour homogénéiser le contenu des puits et placée 15 minutes à 37°C sous ruban adhésif et couvercle afin d'éviter l'évaporation dans les puits.

- Après incubation, 90 μ l de bleu de toluidine sont ajoutés à chacun des puits et immédiatement agités par aspirations et refoulements, à l'aide d'une pipette multicanaux. On change les cônes entre chaque rangée de puits.


- Après coloration, la plaque est recouverte d'un ruban adhésif et conservée une nuit à +4°C avant de procéder à la lecture. La coloration des cellules lavées est plus homogène après plusieurs heures.

Schéma de plaque :

	1	2	3	4	5	6	7	8
aIgE 1×10^2								
aIgE 1×10^3								
aIgE 1×10^4								
"Tyrode- Ca^{++} "								

← n° de code correspondant aux 6 dilutions d'Apis mel 15CH à 20CH et aux 2 dilutions contrôles de NaCl 137 mM.

- 10 μl de dilutions codées et
 - 10 μl de basophiles sont placés dans les puits de la plaque
 PREINCUBATION 30 min t° ambiante
 - 20 μl aIgE ou Tyrode- Ca^{++}
 INCUBATION 15 min 37°C
 - 90 μl bleu de toluidine
 CONSERVATION 1 nuit $+4^\circ\text{C}$
 LECTURE


 ↑
 Témoins sans Ca^{++} : 10 μl de NaCl 137 mM + 10 μl basophiles sont placés dans chacun des deux puits témoins qui sont dits "témoins sans calcium", puis préincubation, + 20 μl de Tyrode sans Ca^{++} → incubation → coloration → lecture

Les témoins "Tyrode sans Ca^{++} " (*) sont ajoutés, au même titre que dans le protocole "activation", pour contrôler la sensibilité des basophiles au calcium.

6) Lecture au microscope et compte des basophiles:

Le principe est identique à celui décrit pour l'activation des basophiles (paragraphe V-3).

7) Les résultats :

Les comptes de basophiles sont reportés dans un tableau à l'image du schéma de la plaque et sont remis pour chaque expérience à la personne ayant fait le code.

a) Interprétation des résultats :

Les expériences, après décodage, ne sont retenues pour interprétation statistique que si elles répondent à 3 critères :

1. Nombre de basophiles dans les témoins supérieur à 35 (basophiles préincubés avec du NaCl 137 mM ou avec *Apis mellifica* et n'ayant pas été mis en présence d'anti-IgE).

2. Sensibilité spontanée des basophiles au calcium seul inférieure à 25% d'achromasie en comparant d'une part les basophiles qui, préincubés avec du NaCl 137 mM, sont, en l'absence de tout anti-IgE, mis en présence de tampon de Tyrode-calcium avec, d'autre part, ceux mis en présence de tampon de Tyrode sans calcium.

3. Présence d'au moins une dose d'anti-IgE présentant une achromasie comprise entre 40 et 60% des basophiles qui, préincubés avec NaCl 137 mM, sont mis en présence d'anti-IgE 1×10^2 à 1×10^4 par rapport à ceux mis en présence de tampon de Tyrode- Ca^{++} sans anti-IgE. Ceci est fondé sur des études préliminaires qui ont montré qu'en-dessous de 40%, l'achromasie des basophiles est trop faible pour que l'étude de l'inhibition puisse être effectuée. Au-dessus de 60%, elle est trop forte pour pouvoir être significativement modulée par des agonistes à haute dilution.

L'achromasie des basophiles est ainsi déterminée:

$$\frac{\text{Nb basos du puits témoin} - \text{Nb basos du puits test}}{\text{Nb basos du puits témoin}} \times 100$$

basos = basophiles

b) Représentation des résultats :

Trois types de résultats (en nombre de basophiles) sont obtenus et doivent être comparés :

- les puits correspondant aux basophiles mis en présence d'*Apis mellifica* ou de NaCl 137 mM mais sans anti-IgE donnent le nombre maximal de basophiles. Ce sont les témoins de référence.

- les puits correspondant aux basophiles mis en présence de NaCl 137 mM et d'anti-IgE sans *Apis*

mellifica donnent le nombre minimal de basophiles (achromasie maximale).

- les puits correspondant aux basophiles mis en présence d'Apis mellifica et d'anti-IgE donnent un nombre de basophiles sur lequel est évalué l'éventuel effet modulateur du produit. Plus ce nombre se rapprochera du nombre maximal de basophiles, plus l'effet inhibiteur sera grand. Inversement, plus ce nombre se rapprochera du nombre minimal de basophiles, plus l'effet inhibiteur sera faible ou nul. S'il devient inférieur à ce nombre minimal, l'effet est activateur.

La représentation graphique :

Pour chaque dose d'anti-IgE testée, les dilutions d'Apis mellifica et les dilutions contrôles de NaCl 137 mM sont portées en abscisses tandis que le nombre de basophiles est porté en ordonnées.

Chaque graphique comporte :

- 1) une courbe qui représente les variations du nombre de basophiles en présence d'anti-IgE en fonction des dilutions d'Apis mellifica et de NaCl 137 mM;
- 2) une courbe qui représente les variations du nombre de basophiles en présence de tampon Tyrode-Ca⁺⁺ sans anti-IgE en fonction des dilutions d'Apis mellifica et de NaCl 137 mM.

c) Analyse statistique des résultats :

L'effet modulateur des dilutions d'Apis mellifica est étudié statistiquement par un test de rang de Whitney-Wilcoxon à l'issue d'une série d'une quinzaine d'expériences indépendantes. On comparera, pour chaque dilution d'Apis mellifica, le nombre de basophiles mis en présence d'une dose d'anti-IgE avec le nombre de basophiles préincubés avec du NaCl 137 mM et mis en présence de la même dose d'anti-IgE.

45

Ces études sont effectuées de façon indépendante par les personnes responsables du contrôle des expériences et de l'interprétation statistique des résultats.

REVENDICATIONS

1. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution à partir d'une solution de dilution déterminée, elle-même provenant d'une solution initiale contenant une substance active, dans lequel la solution initiale contenant la substance active subit une série d'étapes de dilution successives, la première dilution de la solution initiale étant obtenue par prélèvement d'une fraction ou de la totalité de la solution initiale, et le mélange de cette fraction ou de la totalité de la solution initiale dans une solution de dilution, ce qui donne la solution de première dilution, la deuxième dilution de la solution initiale étant obtenue par prélèvement d'une fraction ou de la totalité de la solution de première dilution, et le mélange de cette fraction ou de la totalité de la solution de première dilution dans une solution de dilution, pour donner la solution de deuxième dilution et ainsi de suite, jusqu'à la solution de dernière dilution,

chacune des solutions allant de la solution de première dilution à la solution de dernière dilution constituant une solution de dilution déterminée, caractérisé en ce qu'on procède à une étape d'agitation de la solution de dilution déterminée au minimum après toutes les dix dilutions, de préférence après toutes les trois dilutions et avantageusement après chaque dilution, l'agitation étant constituée par une étape de création de bulles dans la solution de dilution déterminée (ci-après désignée par "bullage") à l'aide d'insufflation de gaz à un taux d'agitation suffisant pour créer la formation d'un vortex dans la solution de dilution déterminée à agiter.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le gaz insufflé est constitué par de l'azote, avantageusement par de l'air.

3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le gaz insufflé a une pression d'environ 5 à environ 6 bars.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel le taux d'agitation est obtenu par insufflation d'air d'un volume allant d'environ du tiers à environ une fois le volume de la solution à agiter, le volume d'air insufflé étant avantageusement un volume d'environ 100 μ l à environ 10 ml, notamment de 500 μ l, sous une pression suffisante et telle que la température ne dépasse pas environ 45°C.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que entre deux dilutions successives, est effectuée une étape de rinçage du dispositif qui permet le prélèvement d'une fraction de la totalité de la solution initiale et de chaque solution intermédiaire et le mélange de cette fraction ou de la totalité dans une solution de dilution.

6. Procédé selon la revendication 5, dans laquelle l'étape de rinçage a lieu entre deux dilutions successives (respectivement désignées par "dilution venant en premier lieu" et "dilution venant en deuxième lieu") peut être effectuée entre la dilution venant en premier lieu et le bullage de la solution de dilution déterminée correspondante, ou peut avoir lieu après le bullage, ou peut être concomitante à chaque dilution.

7. Appareil automatique pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 6, comprenant:

- des moyens pour effectuer les dilutions successives d'une solution initiale contenant une substance active, lesquelles dilutions conduisent à des solutions de dilution déterminée,
- des moyens de bullage programmés pour effectuer le bullage au minimum après toutes les dix dilutions, avantageusement après toutes les trois dilutions et de préférence après chaque dilution,
- éventuellement des moyens de rinçage entre chaque dilution.

8. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution selon la revendication 1, dans lequel

- les dilutions successives sont telles qu'au moins une des solutions de dilution déterminée contient la substance active en quantité inférieure à 10^{-10} moles, avantageusement inférieure à 10^{-12} moles/l et de préférence inférieure à 10^{-14} moles/l, ou ne contient plus de substance active, ladite solution de dilution déterminée présentant encore une activité à des dilutions supérieures à celle à laquelle la substance active a disparu,

et caractérisé en ce que

- on introduit, avant au moins l'une quelconque des dilutions n , n étant un nombre entier supérieur à 0, dans la solution de dilution $n-1$ une substance témoin soluble dans ladite solution et n'interférant pas avec la solution de dilution $n-1$, et la substance témoin présentant la propriété de disparaître entre la dilution $n - 1 + m$ et $n + m$, m étant le nombre de dilutions où est présente la substance témoin, et étant compris notamment de 5 à 8,
- on dose au moins une fois la substance témoin après la dilution n , de préférence au moins une fois dans l'intervalle allant de la dilution n à la dilution

$n - 1 + m$ et au moins une fois dans l'intervalle allant de la dilution $n + m$ à la dilution $n + m + y$, y étant la plage de dilution libre de substance témoin et étant avantageusement compris de 3 à 5,

- et de la dilution n à la dilution $n - 1 + m$, on compare la valeur de la concentration de la substance témoin obtenue et la valeur de la concentration de la substance témoin calculée d'après la dilution, ce qui permet de contrôler quantitativement les dilutions, et

- de la dilution $n + m$ à la dilution $n + m + y$, on vérifie qu'il n'y a plus de substance témoin, ce qui permet de contrôler d'une part la qualité des dilutions et d'autre part l'absence de contamination.

9. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution selon la revendication 8, caractérisé en ce que on introduit au moins deux fois la substance témoin, l'une des deux introductions de la substance témoin étant effectuée dans la solution de dilution $n - 1$, la substance témoin disparaissant entre la dilution $n - 1 + m$ et $n + m$, l'autre introduction est effectuée au plus tôt dans la solution de dilution $n + m$, et de préférence dans la solution de dilution $n + m + y$, n étant un nombre entier supérieur à 0, m étant avantageusement compris de 5 à 8, y étant avantageusement compris de 3 à 5.

10. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution selon la revendication 8, dans lequel

- les dilutions successives sont telles qu'au moins une des solutions de dilution déterminée contient la substance active en quantité inférieure à 10^{-10} moles, avantageusement inférieure à 10^{-12} moles/l et de préférence inférieure à 10^{-14} moles/l, ou ne contient plus de substance active, ladite solution de dilution déterminée présentant encore une activité à des

dilutions supérieures à celle à laquelle la substance active a disparu,

et caractérisé en ce que

- on introduit, avant au moins l'une quelconque des dilutions n , n étant un nombre entier supérieur à 0, dans la solution de dilution $n-1$ une substance témoin soluble dans ladite solution et n'interférant pas avec la solution de dilution $n-1$,

- * la substance témoin présentant la propriété d'être détectable à des dilutions supérieures à celle à partir de laquelle la substance active n'est plus détectable,

et

- * la substance témoin présentant également la propriété de disparaître entre la dilution $n - 1 + m$ et $n + m$, m étant le nombre de dilutions où est présente la substance témoin et étant compris notamment de 5 à 8,

- on dose au moins une fois la substance témoin après la dilution n , de préférence au moins une fois dans l'intervalle allant de la dilution n à la dilution $n - 1 + m$ et au moins une fois dans l'intervalle allant de la dilution $n + m$ à la dilution $n + m + y$, y étant la plage de dilution libre de substance témoin et étant avantageusement compris de 3 à 5,

- et de la dilution n à la dilution $n - 1 + m$ on compare la valeur de la concentration de la substance témoin obtenue et la valeur de la concentration de la substance témoin calculée d'après la dilution, ce qui permet de contrôler quantitativement les dilutions, et
- de la dilution $n + m$ à la dilution $n + m + y$, on vérifie qu'il n'y a plus de substance témoin, ce qui permet de contrôler d'une part la qualité des dilutions et d'autre part l'absence de contamination.

11. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution

selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que la substance témoin présente la propriété selon laquelle si elle est introduite dans la solution initiale avant la première dilution de la solution de départ et si la substance active disparaît (n'est plus détectable) entre la dilution p et la dilution $p + 1$, la substance témoin disparaît entre la dilution $p + x$ et la dilution $p + x + 1$, x étant compris notamment de 2 à 4, p étant compris notamment de 3 à 6.

12. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce que on introduit la substance témoin pour la première fois dans la solution de dilution $n - 1$, puis on réintroduit la substance témoin dans la solution de dilution qui suit celle qui correspond à la disparition de la substance témoin introduite dans la dilution $n - 1$, puis on réintroduit une deuxième fois la substance témoin dans la solution de dilution qui suit celle qui correspond à la disparition de la substance témoin réintroduite et ainsi de suite.

13. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution selon l'une quelconque des revendications 8 à 12, caractérisé en ce que on introduit la substance témoin pour la première fois dans la solution de dilution $n - 1$, la substance témoin disparaissant entre la dilution $n - 1 + m$ et $n + m$, m étant compris notamment de 5 à 8, on réintroduit la substance témoin dans la solution de dilution $n + m + y$, y étant compris de 2 à 10, avantageusement de 3 à 5, et ainsi de suite.

14. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution selon l'une quelconque des revendications 8 à 13, caractérisé en ce que on introduit la substance témoin

pour la première fois dans la solution de dilution $n - 1$, puis toutes les m dilutions, m étant compris de 5 à 15, avantageusement de 10 à 15, et avantageusement encore 10 ou 15.

15. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution selon l'une quelconque des revendications 8 à 14, caractérisé en ce que

- on introduit la substance témoin dans la solution initiale contenant la substance active avant la première dilution de ladite solution initiale,
 - on effectue les dilutions successives de la solution initiale contenant la substance active et la substance témoin, la première dilution de la solution initiale étant obtenue par prélèvement d'une fraction ou de la totalité de la solution initiale, et le mélange de cette fraction ou de la totalité de la solution initiale dans une solution de dilution, ce qui donne la solution de première dilution, la deuxième dilution de la solution initiale étant obtenue par prélèvement d'une fraction ou de la totalité de la solution de première dilution, et le mélange de cette fraction ou de la totalité de la solution de première dilution dans une solution de dilution, pour donner la solution de deuxième dilution et ainsi de suite, jusqu'à la solution de la dernière dilution,
- la substance active disparaît entre la dilution p et la dilution $p + 1$ et la substance témoin disparaît entre la dilution $p + x$ et la dilution $p + x + 1$, p étant compris de 3 à 6, x étant compris de 2 à 4, la solution présentant encore une activité pour au moins une dilution supérieure ou égale à la dilution $p + 1$,
- après la première dilution, on prélève pour au moins une dilution déterminée, à partir de la solution obtenue à l'issue de ladite dilution une quantité suffisante de solution pour doser la substance témoin,

et de préférence on dose la substance témoin à chaque dilution de la dilution 1 à la dilution $p + x$ et de préférence au moins une fois de la dilution $p + x + 1$ à la dilution $1 + p + x + y$, y étant avantageusement compris de 2 à 10, avantageusement de 3 à 5, et avantageusement encore à chaque dilution de la dilution $p + x + 1$ à la dilution $1 + p + x + y$,

- et de la dilution 1 à la dilution $p + x$, on compare la valeur de la concentration de la substance témoin obtenue et la valeur de la concentration de la substance témoin calculée d'après la dilution, ce qui permet de contrôler quantitativement les dilutions et de la dilution $p + x + 1$ à la dilution $1 + p + x + y$, on vérifie qu'il n'y a plus de substance témoin, ce qui permet de contrôler d'une part qu'il n'y a pas eu contamination et d'autre part la qualité des dilutions,

et on procède à une étape d'agitation de la solution de dilution déterminée au minimum après toutes les dix dilutions, de préférence après toutes les trois dilutions, avantageusement après chaque dilution, l'agitation étant constituée par une étape de bullage de la solution de dilution déterminée à l'aide d'insufflation de gaz à un taux d'agitation suffisant pour créer la formation d'un vortex dans la solution de dilution déterminée à agiter.

16. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution selon l'une quelconque des revendications 8 à 15, caractérisé en ce que on introduit pour la première fois la substance témoin avant la première dilution, puis on introduit la substance témoin pour la deuxième fois dans la solution de dilution qui suit celle à laquelle la substance témoin introduite pour la deuxième fois disparaît, puis on introduit une troisième fois la substance témoin dans la solution de

dilution qui suit celle qui correspond à la disparition de la substance témoin introduite la deuxième fois, et ainsi de suite, de façon avantageuse, chaque introduction de la substance témoin a lieu de 2 à 10, avantageusement 3 à 5 dilutions après celle qui correspond à la disparition de la substance témoin précédemment introduite.

17. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution selon l'une quelconque des revendications 8 à 16, caractérisé en ce que on introduit la substance témoin avant la première dilution et toutes les m dilutions, m étant compris de 5 à 15, avantageusement de 10 à 15, et avantageusement encore 10 ou 15.

18. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution selon l'une quelconque des revendications 8 à 17, caractérisé en ce qu'on dose la substance témoin, avantageusement toutes les 10 dilutions, et de préférence encore à chaque dilution.

19. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution selon l'une quelconque des revendications 8 à 18, caractérisé en ce que la solution initiale contient une substance active à raison d'environ 1×10^{-3} à environ 1×10^{-6} moles/l.

20. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution selon l'une quelconque des revendications 8 à 19, caractérisé en ce que la substance témoin est constituée par une enzyme, dont la présence est avantageusement détectable par son activité chromogène.

21. Procédé de fabrication de compositions homéopathiques ou de préparations à haute dilution

selon l'une quelconque des revendications 8 à 20, caractérisé en ce que l'enzyme est choisi parmi la peroxydase, est notamment la peroxydase de raifort, détectable par sa réactivité avec le substrat D-phénylène diamine en milieu H_2O_2 .

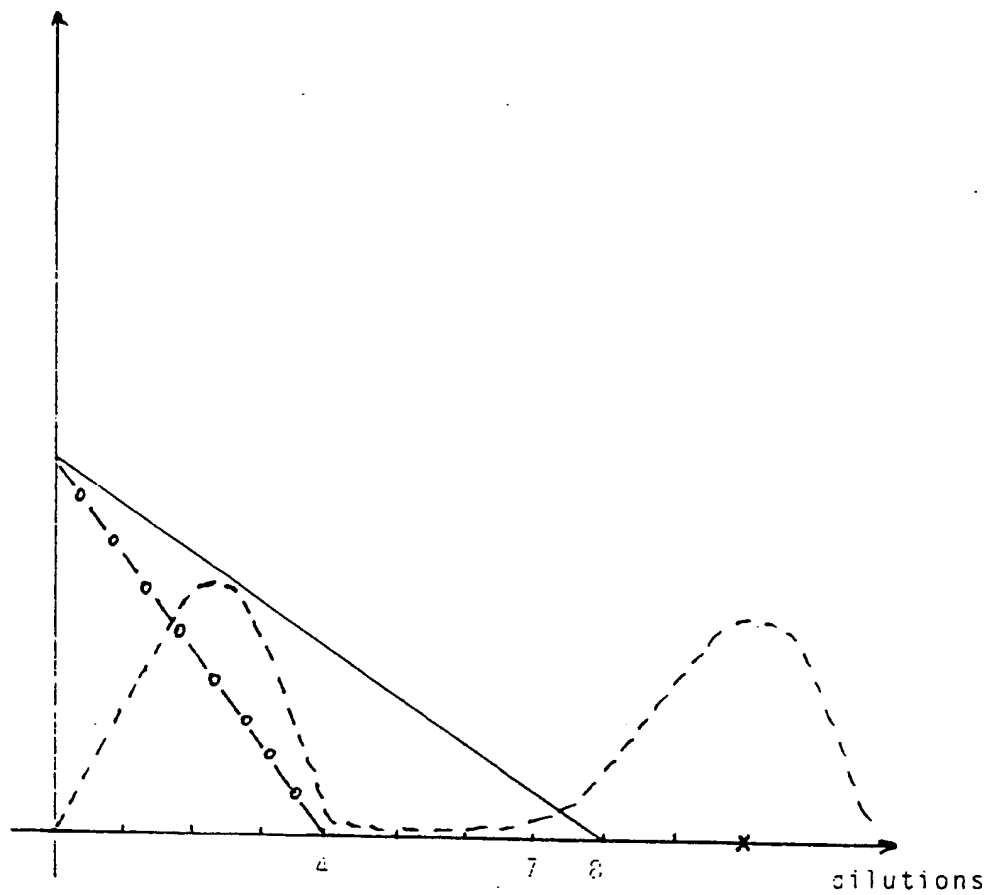
22. Procédé d'obtention d'une solution diluée (mélange) présentant une activité moyenne caractérisé en ce que l'on mélange des solutions de dilution déterminée successives obtenues selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 8 à 21, chaque solution étant de dilution différente, mais correspondant à la même échelle de dilution.

23. Procédé d'accroissement de l'activité d'une solution de dilution déterminée dans lequel la solution de dilution déterminée est obtenue selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 8 à 21, caractérisé en ce que l'on soumet une solution de dilution déterminée à une haute dilution unique.

24. Procédé d'accroissement d'activité d'une solution diluée (mélange) dans lequel la solution diluée est obtenue selon la revendication 22 et dans lequel les solutions de dilution déterminée utilisées sont obtenues selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 8 à 21, caractérisé en ce que l'on soumet ledit mélange à une haute dilution unique.

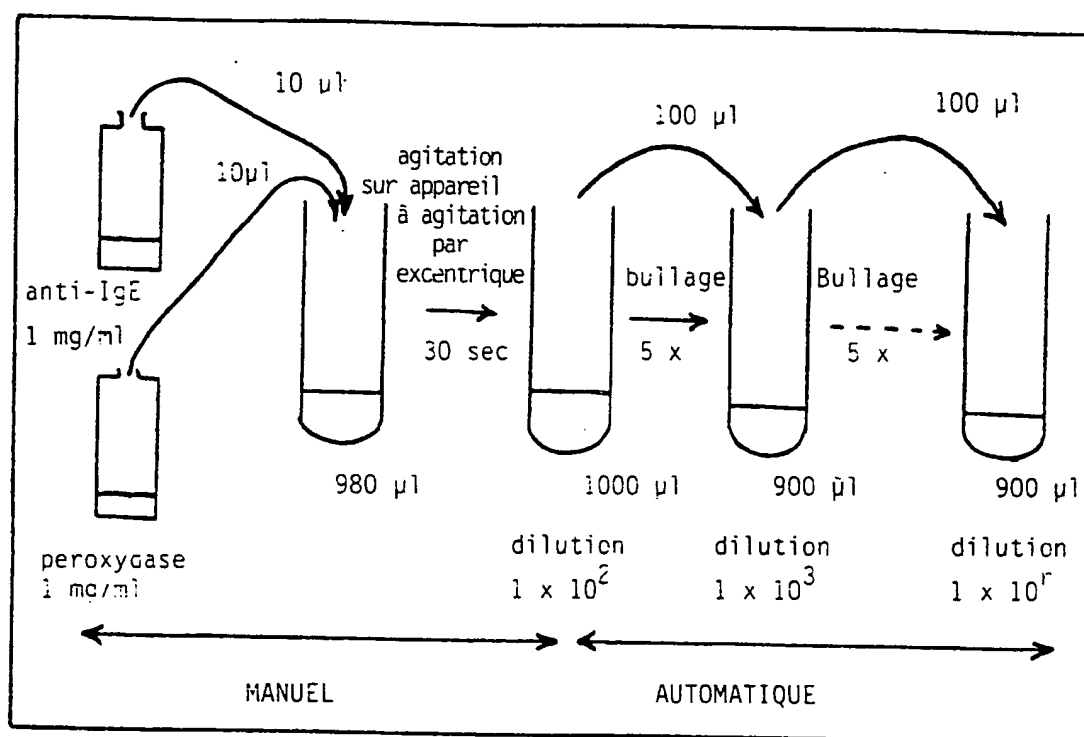
1/4

Figure 1



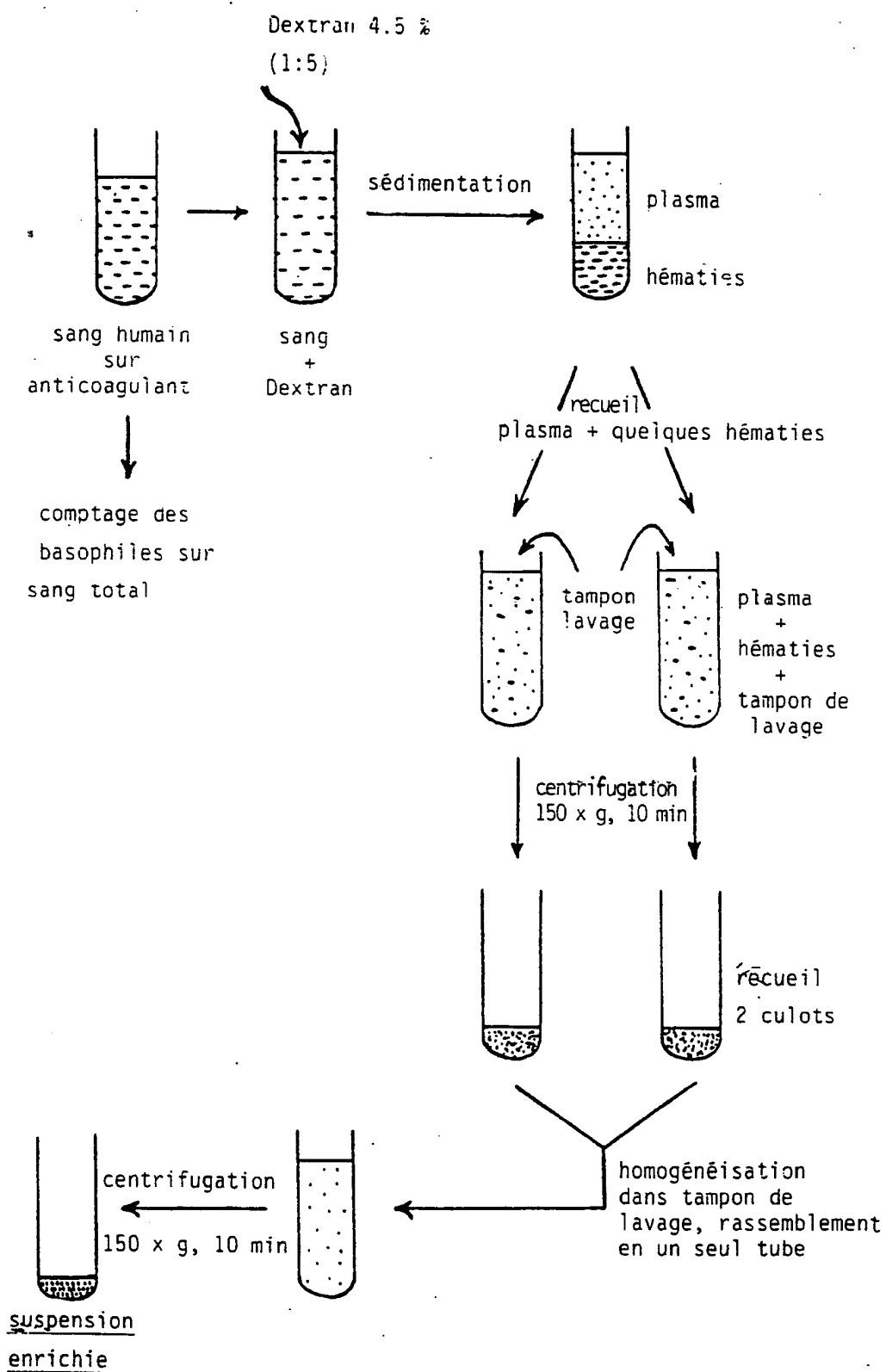
2/4

Figure 2



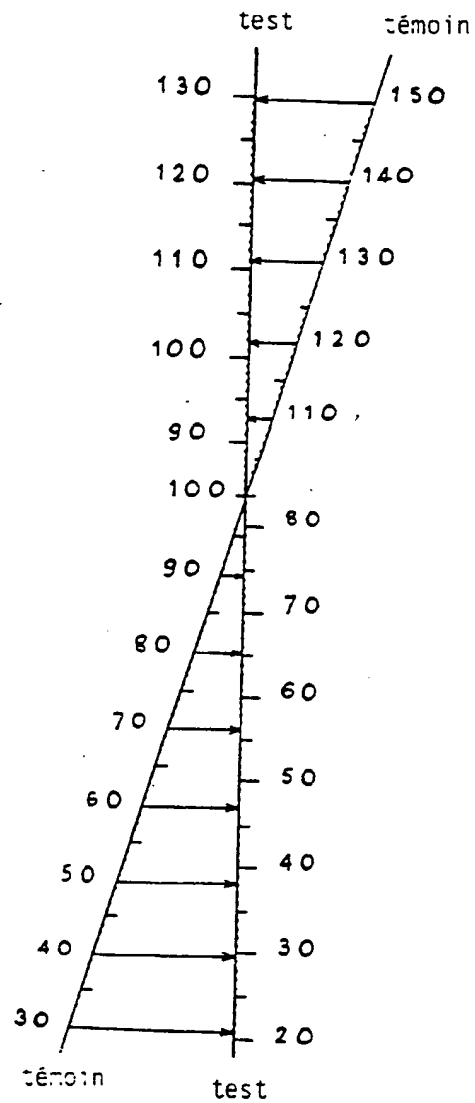
3/4

Figure 3



4/4

Figure 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 91/00206

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) * According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="margin-top: 10px;">Int.Cl.⁵ A 61 K 9/08</div>														
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 5px;">Classification System</td> <td style="padding: 5px;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl.⁵</td> <td style="padding: 5px;">A 61 K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *</div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl. ⁵	A 61 K								
Classification System	Classification Symbols													
Int.Cl. ⁵	A 61 K													
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT * <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category *</th> <th style="width: 60%; padding: 5px;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 30%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">A</td> <td style="padding: 10px;">G. Netien et al.: "Galenica", Vol. 16, "Medicaments Homéopathiques", 2nd edition, 1986, Technique et Documentation, (Paris,FR) pages 87-146, see pages 87-90, paragraphe 2-1.3.2; pages 106-107, paragraphe 2-3.3.3.3; pages 145, 146, paragraphe 4-5 --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">1-24</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">A</td> <td style="padding: 10px;">Patent Abstracts of Japan, Vol. 4, No. 98 (C-18)(580), 15 July 1980 & JP. A, 55059834 (GUNZE K.K.) 6 May 1980, see abstract --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">1,7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">A</td> <td style="padding: 10px;">Kirk-Othmer, "Encyclopedia of Chemical Technology", Vol. 8, "Diuretics to Emulsions", 3rd edition, 1978, Wiley and Sons (New York, US) see page 921, paragraphe "aeration" ----</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">1,7</td> </tr> </table>			Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	A	G. Netien et al.: "Galenica", Vol. 16, "Medicaments Homéopathiques", 2nd edition, 1986, Technique et Documentation, (Paris,FR) pages 87-146, see pages 87-90, paragraphe 2-1.3.2; pages 106-107, paragraphe 2-3.3.3.3; pages 145, 146, paragraphe 4-5 --	1-24	A	Patent Abstracts of Japan, Vol. 4, No. 98 (C-18)(580), 15 July 1980 & JP. A, 55059834 (GUNZE K.K.) 6 May 1980, see abstract --	1,7	A	Kirk-Othmer, "Encyclopedia of Chemical Technology", Vol. 8, "Diuretics to Emulsions", 3rd edition, 1978, Wiley and Sons (New York, US) see page 921, paragraphe "aeration" ----	1,7
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³												
A	G. Netien et al.: "Galenica", Vol. 16, "Medicaments Homéopathiques", 2nd edition, 1986, Technique et Documentation, (Paris,FR) pages 87-146, see pages 87-90, paragraphe 2-1.3.2; pages 106-107, paragraphe 2-3.3.3.3; pages 145, 146, paragraphe 4-5 --	1-24												
A	Patent Abstracts of Japan, Vol. 4, No. 98 (C-18)(580), 15 July 1980 & JP. A, 55059834 (GUNZE K.K.) 6 May 1980, see abstract --	1,7												
A	Kirk-Othmer, "Encyclopedia of Chemical Technology", Vol. 8, "Diuretics to Emulsions", 3rd edition, 1978, Wiley and Sons (New York, US) see page 921, paragraphe "aeration" ----	1,7												
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>														
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Date of the Actual Completion of the International Search</td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Date of Mailing of this International Search Report</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">2nd July 1991 (02-07-91)</td> <td style="padding: 5px;">9 August 1991 (09-08-91)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">International Searching Authority</td> <td style="padding: 5px;">Signature of Authorized Officer</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">EUROPEAN PATENT OFFICE</td> <td></td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	2nd July 1991 (02-07-91)	9 August 1991 (09-08-91)	International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	EUROPEAN PATENT OFFICE					
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report													
2nd July 1991 (02-07-91)	9 August 1991 (09-08-91)													
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer													
EUROPEAN PATENT OFFICE														

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 91/00206

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁵ : A 61 K 9/08		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁵	A 61 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
A	G. Netien et al.: "Galenica", vol. 16, "Médicaments Homéopathiques", 2e édition, 1986, Technique et Documentation, (Paris, FR) pages 87-146, voir pages 87-90, paragraphe 2-1.3.2; pages 106-107, paragraphe 2-3.3.3.3; pages 145, 146, paragraphe 4-5 --	1-24
A	Patent Abstracts of Japan, vol. 4, no. 98 (C-18)(580), 15 juillet 1980 & JP, A, 55059834 (GUNZE K.K.) 6 mai 1980, voir le résumé --	1,7
A	Kirk-Othmer, "Encyclopedia of Chemical Technology", vol. 8, "Diuretics to Emulsions", 3e édition, 1978, Wiley and Sons (New York, US) voir page 921, paragraphe "aeration" -----	1,7
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
2ème juillet 1991	09.08.91	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé F.W. HECK	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.